


Micro-test tube, generally cylindrical in shape, with flat base - has inner radial projections which increase internal surface area without hampering insertion of pipette

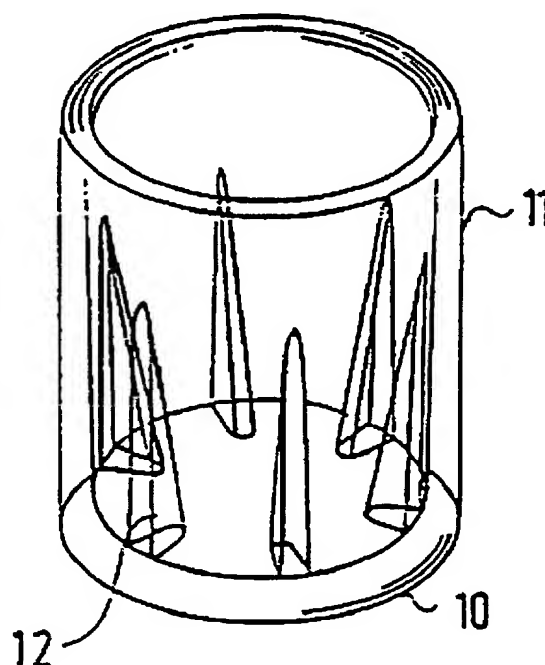
Patent number: FR2697913
Publication date: 1994-05-13
Inventor: ARNE JOHANSSON; PETER ESSER
Applicant: NUNC AS (DK)
Classification:
- **international:** G01N21/03; G01N33/48
- **european:** B01L3/00C2D2; G01N21/03; G01N33/53B2
Application number: FR19920014323 19921127
Priority number(s): DK19920001353 19921106

Also published as:

 DE9216193U (U1)

Abstract of FR2697913

The test tube, comprising a base (10) and a cylindrical wall (11), has a series of inner projections (12) which increase its inner surface area while leaving a central cylindrical space for the insertion of a pipette to introduce or extract a substance and allowing a beam of light to pass through the cylinder for measuring the optical density of the contents. The surface area of the projections is at least 1.1 and preferably at least 1.2 times the surface area of the test tube's inner wall and base, and the surface/volume ratio of the test tube is at least 7.7 cm⁻¹. The test tube's cylinder has a minimum diameter of 2 mm, while the space between opposite projections is at least 0.4 - 0.6 mm. The test tube can have a flat, rounded or conical base, and a cylindrical wall made from a material with suitable optical properties, such as polystyrene, polymethacrylate, PVC, polyethylene terephthalate, polyethylene terephthalate-glycol or polycarbonate. **USE/ADVANTAGE** - Suitable for use in immunodiagnostic analysis. Allows analyses to be made in shorter time with smaller quantities of substances.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 697 913

(21) N° d'enregistrement national :

92 14323

(51) Int Cl⁵ : G 01 N 21/03, 33/48

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 27.11.92.

(30) Priorité : 06.11.92 DK 135392.

(71) Demandeur(s) : NUNC A/S — DK.

(72) Inventeur(s) : Johansson Arne et Esser Peter.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 13.05.94 Bulletin 94/19.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

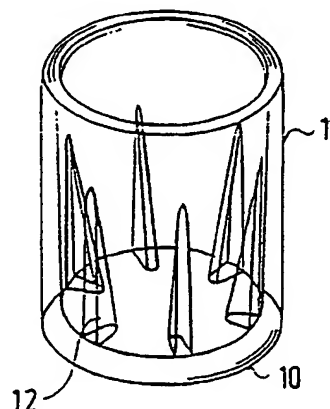
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Hirsch.

(54) Microéprouvette comportant des organes accroissant la surface.

(57) La microéprouvette est destinée à être utilisée pour les
analyses biologiques et comprend une paroi de fond et une
paroi périphérique partant de celle-ci.

Elle comporte une pluralité d'organes 12 accroissant la
surface et disposés dans un espace défini entre la surface
intérieure de la paroi phérique 11 et une surface centrale
imaginaire en forme de cylindrique circulaire coupant la pa-
roi de fond 10, de manière à permettre l'introduction d'une
pipette dans la microéprouvette à travers ledit cylindre cir-
culaire pour introduire ou retirer de la matière et permettre
à un faisceau lumineux de traverser ledit cylindre circulaire.



FR 2 697 913 - A1



MICROEPROUVETTE COMPORTANT DES ORGANES ACCROISSANT LA SURFACE

La présente invention se rapporte à une microépreuve
5 remplissant les fonctions d'une alvéole ou d'un puits et
comportant des organes accroissant la surface.

Des développements dans les analyses d'immunodiagnostic
ont conduit à des demandes accrues pour des procédés et per-
fectionnements dans l'analyse au moyen desquels on puisse
10 obtenir des résultats fiables et reproductibles dans des
temps courts en utilisant une quantité minimum d'un échan-
tillon et d'un agent réactif.

La déposante a découvert qu'un rapport surface/volume
supérieur pour les microépreuves utilisées dans les essais
15 biologiques (ce qui implique des distances de diffusion plus
courtes) peut conduire à une sensibilité plus élevée dans un
temps d'incubation limité au cours d'un dosage en phase soli-
de, tel que ELISA. Ainsi, l'avantage d'un rapport surface/vol-
ume plus élevé réside dans le fait que le temps de dosage
20 peut être réduit. On estime qu'un rapport surface/volume plus
grand n'a pas d'influence négative sur la sensibilité du
dosage. Au contraire, il peut être possible d'obtenir une
sensibilité plus grande dans un temps d'incubation limité.

La présente invention propose une microépreuve amé-
25 liorée destinée à être utilisée dans des analyses biologiques,
en particulier dans des analyses d'immunodiagnostic et dans
d'autres analyses utilisant l'adsorption en phase solide dans
lesquelles au moins un participant au dosage est immobilisé
ou adsorbé. Cette microépreuve est simple et commode à
30 l'usage et fournit des résultats fiables dans une période de

temps qui est plus courte que celle obtenue en utilisant les microéprouvettes bien connues.

La présente invention propose une microéprovette comprenant une paroi de fond et une paroi périphérique partant de celle-ci, caractérisé en ce qu'elle comporte une pluralité d'organes accroissant la surface et disposés dans un espace défini entre la surface intérieure de la paroi périphérique et une surface imaginaire centrale en forme de cylindre circulaire qui coupe la paroi de fond de manière à permettre l'introduction d'une pipette dans la microéprovette à travers le cylindre circulaire pour introduire ou retirer de la matière dans la microéprouvette et de manière à permettre à un faisceau lumineux de traverser le cylindre afin de permettre de mesurer la densité optique de la matière contenue dans la microéprovette.

La paroi de fond peut être une paroi de fond sensiblement plate ou bien elle peut être conique ou hémisphérique et cette paroi de fond peut être fusionnée ou réunie de manière étanche avec la paroi périphérique qui en part. Dans une forme de réalisation préférée, la paroi de fond est prévue avec une qualité optique dans un matériau approprié, tel que par exemple le polystyrène, le polyméthacrylate, le chlorure de polyvinyle (PVC), le polyéthylènetéréphtalate, le polyéthylènetéréphtalateglycol ou le polycarbonate, pour permettre des lectures optiques et colorimétriques d'échantillons à travers le fond des microéprouvettes pour l'analyse par des techniques optiques ou de colorimétrie. Dans une forme d'avantage préférée de l'invention, la paroi de fond est sensiblement plane.

Afin d'obtenir un temps de dosage relativement court, la microéprovette est munie d'au moins un organe accroissant la surface et, de préférence, d'une pluralité d'organes accroissant la surface. Comme cela sera montré dans la partie traitant de l'expérimentation (voir l'exemple 2), le temps de dosage est spectaculairement réduit si on utilise des microéprouvettes munies d'organes accroissant la surface. Ceci est dû au fait que la présence d'organes accroissant la surface

donne lieu à une augmentation de l'aire de la surface intérieure et ainsi à un accroissement du rapport surface/volume; le terme "rapport surface/volume" tel qu'utilisé dans la présente description et les revendications, est destiné à
5 signifier le rapport entre l'aire de la surface et le volume de la partie de la microéprouvette qui est remplie par les participants au dosage, et l'aire de la surface est la somme des aires des surfaces des organes accroissant la surface plus l'aire de la surface intérieure de la paroi périphérique
10 et l'aire de la surface intérieure de la paroi du fond. Cette alimentation à son tour conduit à une distance de diffusion plus courte entre les molécules interactives pendant le dosage et entraîne une réduction de la durée du dosage.

Les organes accroissant la surface sont disposés dans
15 un espace défini entre la surface intérieure de la paroi périphérique et une surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire et coupant la paroi de fond, de sorte qu'il est possible d'introduire une pipette dans la microéprouvette à travers le cylindre circulaire pour introduire
20 ou retirer de la matière de la microéprouvette. En général, l'échantillon qui doit être analysé (appelé "analyte") est introduit dans la microéprouvette au moyen d'une pipette. Ainsi, il est important que la surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire coupant la paroi de fond ait un
25 diamètre d'au moins 2 mm, de préférence d'au moins 3 mm, et atteigne par exemple environ 4 mm.

En outre, l'espace contenu d'une surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire coupant la paroi de fond est important pour permettre à un faisceau de lumière
30 de traverser le cylindre afin de mesurer la densité optique de la matière contenue dans la microéprouvette. D'une manière générale, les exigences quant à la taille du diamètre de la surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire destinée à permettre des mesures optiques fiables conduisent
35 à estimer que le diamètre doit être d'au moins 2 mm, de préférence d'au moins 3 mm, par exemple d'environ 4 mm.

Pour obtenir une réduction prononcée de la durée du dosage, c'est-à-dire une réduction supérieure à 10%, de préférence

supérieure à 30%, l'aire de la surface des organes accroissant la surface avec la surface intérieure de la paroi périphérique et de la paroi de fond de la microéprouvette est supérieure de préférence d'au moins 1,1, de préférence d'au moins 1,2 et de préférence encore d'au moins 1,4 fois à l'aire de la surface intérieure de la paroi périphérique et de la paroi de fond de la microéprouvette seules.

Dans une forme de réalisation préférée, le rapport surface/volume de la microéprouvette est d'au moins $7,7 \text{ cm}^{-1}$, ce rapport surface/volume étant calculé sur la base de la partie de la microéprouvette qui est remplie avec les participants au dosage pendant le dosage [dans les exemples donnés ci-dessous, le volume de la microéprouvette qui est rempli des participants au dosage correspond à 200 μl . Lorsque ce volume est utilisé, les organes accroissant la surface en forme de nervure (voir plus bas) sont juste couverts par le liquide]. Dans l'exemple 2 de la partie concernant l'expérimentation, il ressort qu'un accroissement du rapport surface/volume d'environ 30% donne lieu à une diminution de T_{90} (T_{90} est la durée d'incubation nécessaire pour obtenir 90% de l'adsorption maximale) d'environ 42,6% (résultat obtenu à partir des microéprouvettes contenant six organes accroissant la surface) et pour des microéprouvettes contenant dix organes accroissant la surface, les valeurs correspondantes sont respectivement d'environ 49% et d'environ 57,3%.

Les organes accroissant la surface peuvent être disposés libres dans la microéprouvette sous la forme d'un insert séparé ou bien ils peuvent être fixés à la surface intérieure de la paroi de fond et/ou de la surface intérieure de la paroi périphérique.

Dans une forme de réalisation préférée, les organes accroissant la surface sont fixés à la surface intérieure de la paroi périphérique.

Dans une forme de réalisation préférée, les organes accroissant la surface sont disposés adjacents à la paroi de fond, par exemple fixés à la paroi de fond. En outre, les organes accroissant la surface s'étendent de préférence depuis

la surface intérieure de la paroi périphérique, radialement dans l'espace intérieur de la microépreuve.

Les organes accroissant la surface peuvent avoir toutes formes appropriées, sous réserve que les exigences de ménager un espace contenant la surface imaginaire centrale en forme de cylindre circulaire, soient satisfaites. Dans une forme de réalisation préférée, les organes accroissant la surface comprennent des nervures ou parties en saillie s'étendant axialement, ménagées sur la surface intérieure de la paroi périphérique.

Dans une forme de réalisation préférée, les organes accroissant la surface sont réalisés sous la forme de nervures fixées à la surface intérieure de la paroi de fond aussi bien qu'à la surface intérieure de la paroi périphérique. Les nervures sont en forme de coins et la partie en saillie radiale des nervures vers le haut décroît à partir du fond.

Le nombre des organes accroissant la surface selon l'invention est de préférence d'au moins quatre des organes, de préférence d'au moins six organes, par exemple six, huit ou dix organes accroissant la surface.

La distance minimale entre deux organes accroissant la surface disposés de manière adjacente est de préférence comprise entre 0,4 et 0,6 mm.

La surface intérieure de la paroi périphérique définit de préférence une surface cylindrique sensiblement circulaire.

La microépreuve, aussi bien que les organes accroissant la surface, peuvent être réalisés dans le même matériau ou dans des matériaux différents. La microépreuves et/ou les organes accroissant la surface peuvent être non traités mais ils peuvent aussi être traités physiquement ou chimiquement pour augmenter l'adsorption et/ou l'immobilisation de certains réactifs ou analytes.

A des fins d'analyse, l'utilisation d'une pluralité de microépreuves est généralement nécessaire. Ces microépreuves peuvent en conséquence être assemblées en ce qu'on appelle une plaque de microdosage. On doit comprendre que les microépreuves d'une telle plaque de microdosage

peuvent être disposées sous la forme d'une matrice, par exemple une matrice 8x12, c'est-à-dire huit rangées et douze colonnes avec un total de 96 microéprouvettes. Ces micro-éprouvettes peuvent être facilement séparables les unes des autres ou certaines d'entre eux au moins peuvent être réunis.

D'autres buts, avantages et caractéristiques apparaîtront à la lecture de la description de divers modes de réalisation de l'invention, faite à titre non limitatif et en regard du dessin annexé, où:

- 10 - la figure 1 est une vue en perspective d'une première forme de réalisation de la microéprouvette selon l'invention;
- la figure 2 est une vue en perspective d'une seconde forme de réalisation de la microéprouvette selon l'invention;
- 15 - la figure 3 est une vue en perspective d'une troisième forme de réalisation selon l'invention, disposée suivant une rangée dans un cadre de microdosage;
- 20 - les figures 4, 5 et 6 illustrent trois formes de réalisation différentes de la microéprouvette selon l'invention, représentées à échelle réduite;
- la figure 7 illustre la matrice de la plaque de microdosage utilisée dans l'exemple 1;
- 25 - la figure 8 illustre la matrice de la plaque de microdosage utilisée dans l'exemple 1; et
- la figure 9 représente des courbes de simulation de données cinétiques d'adsorption.

30 La microéprouvette représentée aux figures 1 et 2 comprend une paroi de fond 10 qui est réalisée en un matériau transparent de qualité optique, tel qu'une matière plastique comme le polystyrène. A partir de cette paroi de fond 10, s'étend une paroi périphérique 11 qui, dans ces modes de réalisation, définit une surface cylindrique sensiblement circulaire. Une pluralité de nervures accroissant la surface 35 12 formées monobloc avec la paroi périphérique 11 s'étend radialement à partir de la surface intérieure de la paroi

périphérique 11 et axialement vers le haut à partir de la paroi de fond 10. La forme de réalisation représentée à la figure 1 comprend dix nervures accroissant la surface et la forme de réalisation représentée à la figure 2 comprend six
5 nervures accroissant la surface. Les parties de surface dirigées radialement vers l'intérieur des nervures 12 définissent une surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire coupant la paroi de fond 10.

Lorsque les microéprouvettes représentées aux figures 1 et 2 sont utilisées, elles sont placées en position verticale telle que représentée aux figures 1 et 2. Une quantité appropriée d'échantillons sous forme liquide est introduite au moyen d'une pipette dans l'espace intérieur de la microéprouvette, suivie par des réactifs appropriés. Afin d'assurer des
15 résultats analytiques fiables, le remplissage total de la microéprouvette doit être le même pour les mêmes types d'analyse. En général, le remplissage de la microéprouvette par la matière est tel qu'au plus la totalité ou sensiblement la totalité des organes accroissant la surface 12 est couverte
20 par la matière.

L'utilisation d'une microéprouvette selon l'invention est destinée à des buts analytiques. Pendant l'analyse, il est très courant pour des mesures optiques d'utiliser la même microéprouvette que celle qui était utilisée pendant la réaction analytique. Dans ce cas, la surface centrale en forme de cylindre circulaire coupant la paroi de fond 10 mentionnée
25 précédemment doit permettre à un faisceau lumineux de traverser la microéprouvette sans donner naissance à une réfraction et/ou adsorption intempestive.

La figure 3 représente une partie d'un châssis de microdosage comprenant des microéprouvettes selon l'invention. Les microéprouvettes selon l'invention sont très similaires aux microéprouvettes des figures 1 et 2 mais les microéprouvettes représentées à la figure 3 contiennent huit organes accroissant la surface 12. En référence aux figures 1 et 2, les
35 éléments semblables sont affectés des mêmes chiffres de référence. Dans une plaque de microdosage, les microéprouvettes sont disposées suivant une rangée et la figure 3 illustre une

variation de disposition spécifique entre des microéprouvettes ayant des organes accroissant la surface 12 et des microéprouvettes dépourvus de tels organes. En général, on préfère que la plaque de microdosage comprenne des microéprouvettes
5 qui tous ont des nervures d'accroissement de surface 12.

Les figures 4, 5 et 6 représentent des formes de réalisation modifiées de la microéprouvette selon l'invention. Ainsi, la forme de réalisation des figures 4 et 6 présente une paroi de fond plane 10 tandis que la paroi de fond de la
10 forme de réalisation représentée à la figure 5 présente une forme de dôme ou sensiblement hémisphérique. La forme de réalisation de la figure 4 présente un bord relativement aigu défini entre la paroi de fond et la paroi périphérique. La
forme de réalisation de la figure 5 a un bord incurvé défini
15 entre la paroi de fond et la paroi périphérique.

La figure 7 représente la matrice d'une des plaques de microdosage utilisées dans l'exemple 1. Le symbole (o) correspond aux microéprouvettes normales et le symbole (\square) correspond à des microéprouvettes ayant six nervures accroissant la
20 surface.

La figure 8 représente la matrice d'une autre des plaques de microdosage utilisées dans l'exemple 1. Le symbole (o) correspond à des microéprouvettes normales et (*) correspond à des microéprouvettes ayant dix nervures d'accroissement de
25 surface.

Les plaques de microdosage représentées aux figures 7 et 8 ont été utilisées dans des expériences (voir l'exemple 1) réalisées pour démontrer que des microéprouvettes ayant des nervures accroissant la surface présentent sensiblement la
30 même uniformité d'adsorption ou meilleure que des microéprouvettes sans aucune organe accroissant la surface. L'exemple 1 a démontré que des microéprouvettes ayant des nervures accroissant la surface ont sensiblement la même uniformité
d'adsorption que des microéprouvettes sans aucun organe
35 accroissant la surface. Ainsi, l'utilisation de microéprouvettes ayant des nervures accroissant la surface s'est avérée satisfaisante pour des besoins analytiques.

La figure 9 représente des courbes de simulation de données cinétiques d'adsorption avec des microéprouvettes normales (o/___), des microéprouvettes à six organes accroissant la surface (□/---) et des microéprouvettes à dix organes accroissant la surface (*/*...). La figure 9 montre des points de densité optique à 490 nm en milli-unités d'extinction (mEU) rapportés à des durées d'incubation en heures. La durée d'incubation illustrée par interpolation est la T_{90} , c'est-à-dire la durée d'incubation nécessaire pour obtenir 90% de l'adsorption maximum. La courbe démontre que T_{90} est atteint plus rapidement pour des microéprouvettes à dix nervures accroissant la surface que pour des microéprouvettes ayant six nervures d'accroissement de surface, lesquelles à leur tour atteignent T_{90} plus rapidement que des microéprouvettes dépourvues d'organe accroissant la surface.

On comprendra que différentes variations et modifications des formes de réalisation décrites en référence aux dessins peuvent être réalisées dans le cadre de la présente invention. Ainsi, les organes accroissant la surface peuvent être réalisés sous la forme d'un insert séparé qui peut être inséré dans une microéprovette. En outre, les organes accroissant la surface peuvent présenter toutes formes augmentant la surface et peuvent être réalisés en tous matériaux appropriés, tels que par exemple des matériaux poreux comme, par exemple, des fibres minérales ou métalliques.

L'invention est décrite en outre dans les exemples suivants non limitatifs.

EXEMPLES

Exemple 1

Comparaison de microéprouvettes dépourvues d'organe accroissant la surface avec des microéprouvettes munies d'organes accroissant la surface - Détermination du coefficient de variation

Le coefficient de variation (CV) est une mesure de la variation des valeurs de la densité optique (OD) entre des microéprouvettes dans la matrice d'une plaque de microdosage et il est utilisé comme mesure de l'uniformité d'adsorption entre les microéprouvettes. Plus CV est petit, plus la per-

formance en matière d'adsorption des microépreuves est uniforme sous réserve que toutes les autres incertitudes expérimentales soient égales.

L'expérience suivante a été réalisée pour démontrer
5 s'il était possible, dans le cas de microépreuves munies d'organes accroissant la surface d'obtenir des coefficients de variation du même ordre d'amplitude que les coefficients de variation pour des microépreuves dépourvues d'organe accroissant la surface (dans la présente description dénom-
10 mées "microépreuves normales").

On a essayé deux types de bandes d'essai MaxiSorp F8 à huit éprouvettes à fond plat (catalogue Nunc n° 468667), l'une avec des microépreuves à six organes accroissant la surface (dénommées ci-après microépreuves à six nervures)
15 en position E et H (voir la figure 7), et l'autre avec des microépreuves à dix organes accroissant la surface (dénommées ci-après microépreuves à dix nervures) en position A' et B' (voir la figure 8).

Chaque type a été assemblé dans des matrices de micro-
20 dosage ayant 8x12 microépreuves. Les microépreuves à six nervures et à dix nervures furent respectivement essayées selon le test standard décrit ci-dessous en même temps qu'avec deux rangées (B et G' des figures respectives 7 et 8) de microépreuves normales (catalogue Nunc n° 468667) selon
25 trois expériences indépendantes avec cinq de chaque matrice, c'est-à-dire 120 microépreuves de chacun des types, pour chaque expérience.

La procédure standard utilisée était la suivante (cf. bulletin Nunc, n° 4, juin 1987):

- 30 1. ajouter un mélange de revêtement anticorps consistant en 3 300 ng de IgG de lapin (Dako 1008, 10 mg/ml, dilué à 1/3000) et 36 ng de IgG/HRP de lapin (Dako D128, 1,3 mg/ml, dilué à 1/36 000) par ml de tampon carbonaté 0,05M, pH 9,6, 200 µl. Sceller les microépreuves
35 avec un ruban adhésif pour prévenir l'évaporation;
2. incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant une nuit;
3. laver trois fois (Nunc-Immuno Wash) dans PBS à 0,15M

(tampon salin au phosphate) avec 0,2M d'extra NaCl contenant 0,05% de Triton X-100, pH 7,2;

4. ajouter une solution au substrat, consistant en 0,5 µl de H₂O₂ à 30% et 0,6 mg de OPD.2HCl (dichlorhydrate d'orthophénylènediamine, Fluka 78440) par ml de tampon 0,1M de phosphate-citrate, pH 5,0, 200 µl;
5. Arrêter la réaction du substrat après 3,5 à 4 minutes en ajoutant H₂SO₄ 2N, 150 µl;
6. lire les valeurs OD (densité optique) à 490 nm comparé à un substrat non converti dans un lecteur immuno NJ 2000 (Nippon InterMed);
7. calculer le CV pour les mesures OD d'une matrice 8x12 de microéprovettes selon la formule suivante:

$$CV = S \frac{100\%}{X} - \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N-1}} \cdot \frac{100\%}{\bar{X}}$$

dans laquelle:

S = déviation standard des lectures OD

\bar{X} = moyenne des lectures OD

X = lecture OD individuelle

N = nombre de lecture (microéprovettes)

On a obtenu les résultats suivants:

TABLEAU 1

			Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
25		X mEU	961	954	908
	rangée B	CV %	1,6	2,2	2,7
		X mEU	1006	977	919
	o rangée G'	CV %	1,6	2,4	2,6
30		X mEU	984	966	913
	total	CV %	2,8	2,6	2,7
		X mEU	1132	1126	1074
	rangée E	CV %	2,1	2,4	2,4
35		X mEU	1185	1182	1115
	□ rangée H	CV %	2,5	3,1	2,6
		X mEU	1159	1154	1095
	total	CV %	3,3	3,7	3,1

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
	X mEU	1315	1344	1198
	rangée A'			
	CV %	1,7	2,1	3,0
5	X mEU	1279	1297	1162
	* rangée D'			
	CV %	2,1	2,0	2,1
	X mEU	1297	1320	1180
	total			
	CV %	2,3	2,7	3,0

10 Les symboles dans la première colonne du tableau 1 correspondent au type de microéprouvettes utilisé (cf. figures 7 et 8, et mEU = milli-unités d'extinction).

15 Selon les exigences générales du déposant en matière de CV, on devrait obtenir un CV de moins de 5% pour une matrice de microéprouvettes de 8x12. Comme cela ressort des résultats donnés dans le tableau 1 ci-dessus, ce critère est satisfait pour toutes les microéprouvettes qui ont été essayées au cours de cette expérience.

20 En outre, comme aucune lecture OD individuelle ne dévie de plus de 10% de la valeur moyenne pour chaque type de microéprouvettes, on a conclu qu'une matrice consistant en microéprouvettes à nervures satisferait plus vraisemblablement à un critère de certification de CV < 5%, toutes les lectures individuelles étant situées dans une fourchette à $\pm 10\%$ de la

25 moyenne.

Exemple 2

Détermination du temps d'incubation

30 Huit microéprouvettes du même type que celles utilisées dans l'exemple 1 étaient mises à incuber pour des durées différentes avec 200 μ l d'un mélange d'une conjugaison IgG-HRP (Dako P128) et d'IgG pur (Dako A008) (1/10) sous une concentration totale de 0,333 μ g/ml, suivi par une réaction du substrat avec 200 μ l d'une solution de substrat H_2O_2 /OPD (cf. exemple 1, article 4), pour rechercher une relation

35 possible entre le rapport surface/volume et la durée d'incubation.

Les cinétiques d'adsorption (figure 9) étaient simulées suivant l'équation suivante:

$$\frac{B_t}{A} = E_t = \frac{1 - \exp\{(F-1).P.2.D\frac{1}{2}.t\frac{1}{2}\}}{1/F - \exp\{(F-1).P.2.D\frac{1}{2}.t\frac{1}{2}\}} \quad \left(\begin{array}{l} F \text{ pour } F < 1 \\ 1 \text{ pour } F \geq 1 \end{array} \right)$$

dans laquelle:

- 5 B_t = nombre de molécules liées à l'instant t
 t = durée d'adsorption écoulée en heures
 A = nombre de molécules en monocouche
 E_t = fraction de A occupé à l'instant t
 F = C/A dans lequel C = nombre initial de molécules en solution
10 P = rapport surface/volume en cm^{-1}
 D = constante de diffusion de IgG = $1,44 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ h}^{-1}$

La figure 9 montre les valeurs obtenues pour les types expérimentés de microéprovettes (représentées par des points simples) avec les courbes de simulation obtenues en utilisant l'équation des cinétiques d'adsorption mentionnée ci-dessus et les paramètres donnés ci-dessous sur le tableau 2.

TABLEAU 2

Paramètres des simulations de données de la figure 9.

20 T_{90} est la durée d'incubation nécessaire pour obtenir 90% de l'adsorption maximum calculée à partir de l'équation mentionnée ci-dessus; V = volume de liquide; S = aire de la surface. Les symboles donnés dans la première colonne indiquent le type de microéprovettes employé (cf. figures 7 et 8). La dernière rangée donne les chiffres interpolés pour une éprouvette à huit nervures (8) qui peut être la configuration préférée, eu égard aux laveurs et aux distributeurs.

Config.	V cm ³	S cm ²	P cm ⁻¹	Conc. g/cm ³	F	T_{90} h	$T_{90} \cdot P^2$ h/cm ²
o	0,2	1,54	7,7	$0,333 \cdot 10^{-6}$	0,108	17,8	1055
□	0,2	2,0	10,0	0,333 "	0,0832	10,2	1020
*	0,2	2,3	11,5	0,333 "	0,0723	7,6	1005
(8)	0,2	2,15	10,8	0,333 "	0,0774	8,8	1025

Comme on le voit à la figure 9, une diminution accentuée de la durée d'incubation est obtenue dans ceux des cas

où l'on utilise des microéprouvettes nervurées. Quand on utilise des microéprouvettes normales, une durée d'incubation d'environ 17,8 heures est nécessaire pour obtenir 90% de l'adsorption maximum, tandis qu'une durée d'incubation de
5 seulement 7,6 heures approximativement est nécessaire avec des microéprouvettes à dix nervures (c'est-à-dire une réduction de la durée d'incubation d'approximativement 57,3%).

La constance approchée des chiffres de la dernière colonne ($T_{90}.P^2$) du tableau 2 indique que la durée d'incubation
10 peut être réduite par des facteurs qui sont égaux aux carrés des facteurs d'incrément spécifiques surface/volume.

On a trouvé en outre que cette réduction de la durée d'incubation serait également valable non seulement pour des adsorptions de la première couche, mais pour n'importe quelle
15 couche d'une séquence de biodosage en phase solide.

Bien entendu, la présente invention n'est pas limitée aux modes de réalisation décrits et représentés mais elle est susceptible de nombreuses variantes accessibles à l'homme de l'art sans que l'on ne s'écarte de l'esprit de l'invention.
20

25

30

35

REVENDEICATIONS

1.- Microéprouvettes destinée à être utilisée pour les analyses biologiques et comprenant une paroi de fond et une paroi périphérique partant de celle-ci, caractérisé en ce qu'elle comporte une pluralité d'organes (12) accroissant la surface et disposés dans un espace défini entre la surface intérieure de la paroi périphérique (11) et une surface centrale imaginaire en forme de cylindre circulaire coupant ladite paroi de fond (10) de manière à permettre l'introduction d'une pipette dans la microéprouvette à travers ledit cylindre circulaire pour introduire ou retirer de la matière dans la microéprouvette de manière à permettre à un faisceau lumineux de traverser ledit cylindre circulaire afin de permettre de mesurer la densité optique de la matière contenue dans la microéprouvette.

2.- Microéprouvette selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'aire de la surface desdits organes (12) accroissant la surface augmentée de ladite surface intérieure de la paroi périphérique (11) et de la surface intérieure de ladite paroi de fond (10) de la microéprouvette est supérieure d'au moins 1,1 fois et de préférence d'au moins 1,2 fois à l'aire de la surface intérieure de la paroi périphérique (12) et de la surface intérieure de la paroi de fond (10) seules.

3.- Microéprouvette selon la revendication 1, caractérisée en ce que le rapport surface/volume de ladite microéprouvette est d'au moins $7,7 \text{ cm}^{-1}$.

4.- Microéprouvette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que chacun desdits organes (12) accroissant la surface est fixé à la surface intérieure de la paroi périphérique (11).

5.- Microéprouvette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les organes (12) accroissant la surface sont disposés adjacents à la paroi de fond (10).

6.- Microéprouvette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la surface intérieure de la paroi périphérique (11) définit une surface

cylindrique sensiblement circulaire.

7.- Microéprouvette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les organes (12) accroissant la surface comprennent des nervures ou parties en saillie s'étendant axialement, ménagées sur la surface intérieure de la paroi périphérique (11).

8.- Microéprouvette selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les organes (12) accroissant la surface s'étendent à partir de la surface intérieure de la paroi périphérique (11) radialement dans l'espace intérieur de la microéprouvette.

9.- Microéprouvette selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins quatre organes (12) accroissant la surface.

10.- Microéprouvette selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comporte huit organes (12) accroissant la surface.

11.- Microéprouvette selon la revendication 7, caractérisée en ce que la distance minimale entre deux nervures ou parties en saillie accroissant la surface et disposées de manière adjacente est de l'ordre d'environ 0,4 à 0,6 mm.

12.- Microéprouvette selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit cylindre circulaire central présente un diamètre d'au moins 2 mm.

13.- Une plaque de microdosage caractérisée en ce qu'elle comprend une pluralité de microéprouvettes selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.

30

35

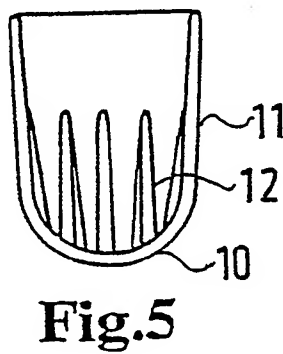
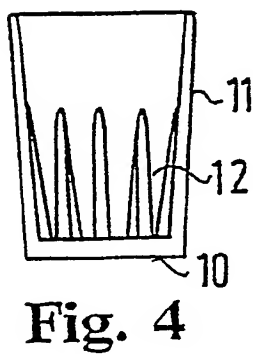
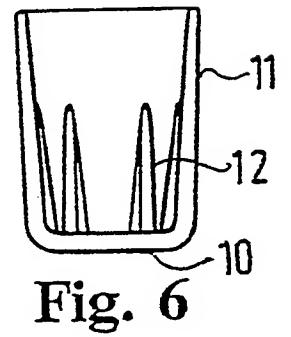
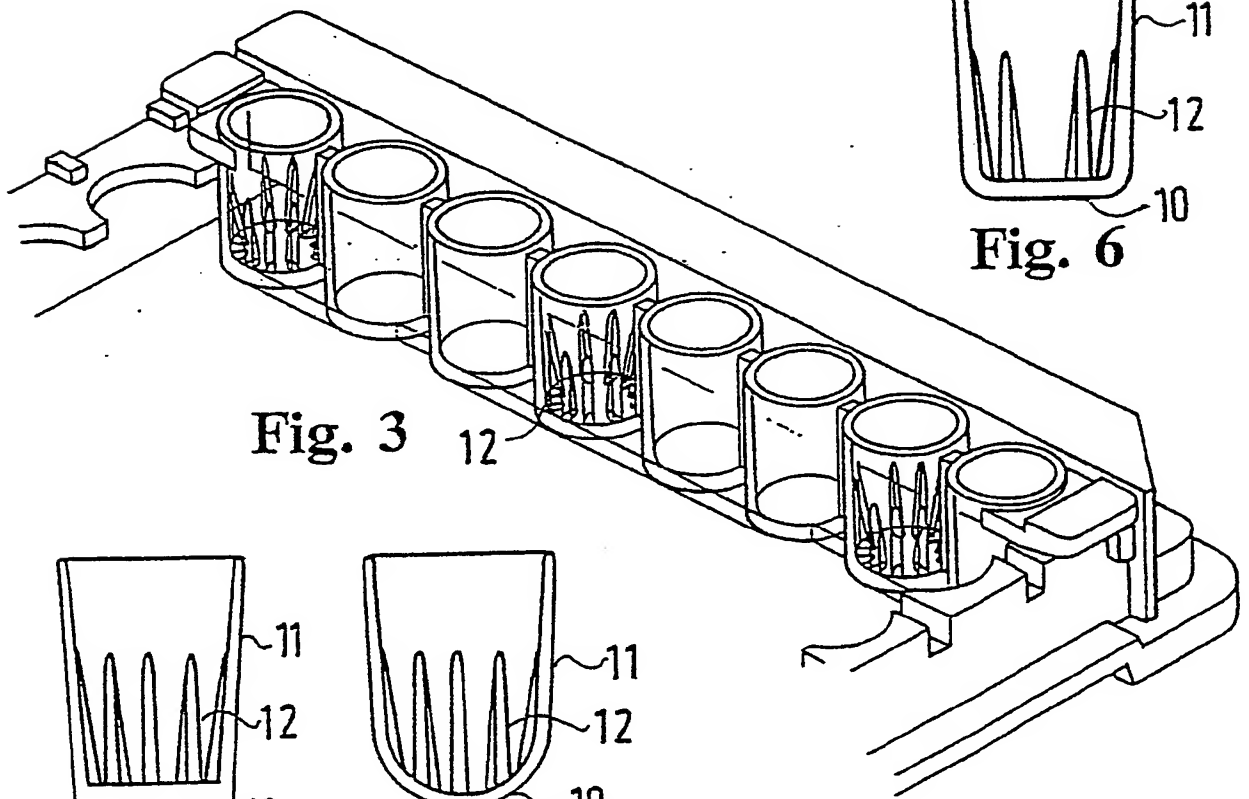
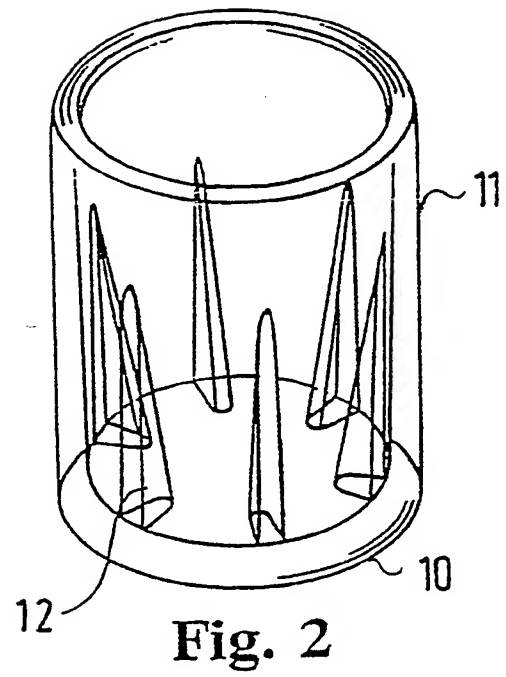
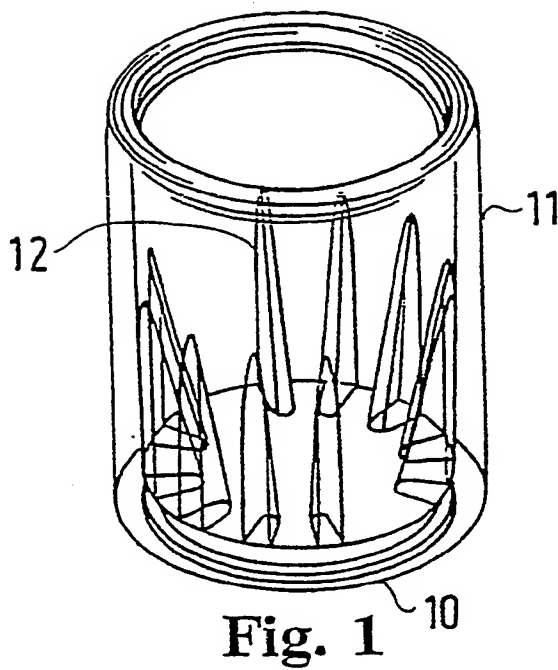


FIG. 7

A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

FIG. 8

A'	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
B'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D'	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
E'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G'	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

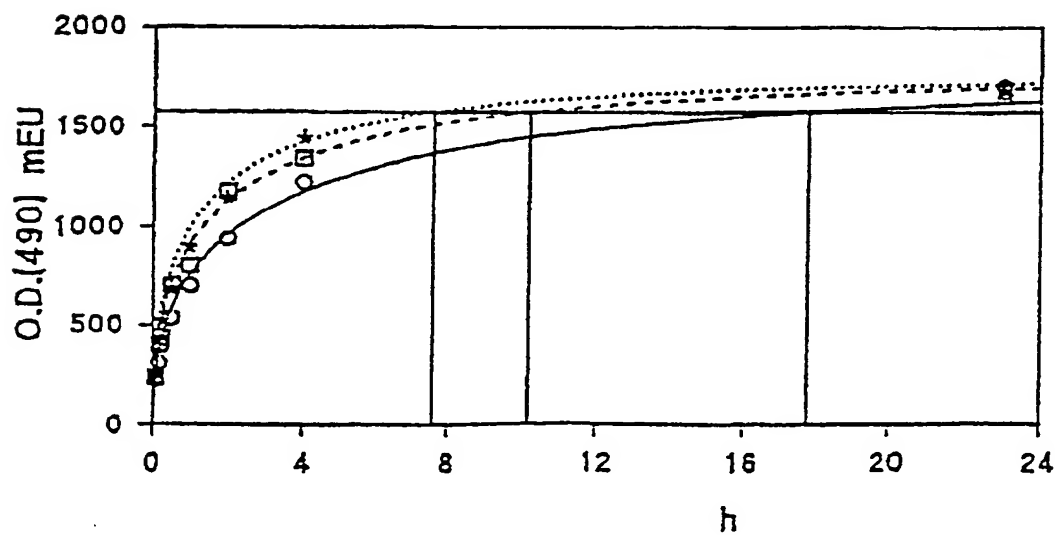


FIG. 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)